

岡山県立高松農業高等学校

廣田 耕治

研究主題「乳用乳酸菌における代謝機能の検索とその有効利用に関する研究」

平成 11 年度文部省産業教育内地留学生として、平成 11 年 4 月 1 日より平成 12 年 3 月 31 日までの 1 年間、岡山大学農学部において研修を行いましたので概要を報告致します。

1 はじめに

研修先の岡山大学農学部畜産食品機能学研究室は、乳酸菌の分離・同定、遺伝・育種、バクテリオシン（抗菌活性物質）の検索を中心としたプロバイオティクス、機能性食品等に関する研究を行っており、国内だけでなくアジアやアフリカ各地の乳酸菌研究にも貢献している。

今回の研修では、乳用乳酸菌についての知識と実験手法、乳製品を製造する上での研究方法等を習得し、農業教育における乳製品の学習に役立てることを目的としている。具体的には、研究室で保存している乳酸菌（中国新疆ウイグル自治区の発酵乳キテックより分離）や学校の実習で使っているハンセン社のヨーグルト・チーズ用混合菌スターターで分離・同定、培養条件の検討、代謝機能の検索、有用機能を活用した製品の基礎製造実験等を行った。

2 研修内容

(1) 乳酸菌の分離

生食水で希釈した試料を混釈法により BCP 加プレートカウント寒天培地や MRS 寒天培地で培養する。3 日後に培地中のコロニーを釣菌して、液体培地で培養後、リトマスミルク培地で保存する。同時に至適温度の検討や菌数の測定を行う。

(2) 乳酸菌の同定

分離した乳酸菌を液体培地で 3 回継代培養した後、以下の同定試験を行う。

グラム染色・形態観察

- 生育温度 (10、15、37、40、45 )
- グルコースからのガス生成 (発酵型)
- ホモ発酵 (-)、ヘテロ発酵 (+)
- アルギニンからのアンモニア生成
- 馬尿酸ナトリウムの分解性
- 耐塩性 (NaCl : 4 %、6.5 %)
- 生成乳酸の施光性 (D 型、DL 型、L 型)
- 糖類の発酵性 (22 種類)

を基に試験菌の分類を行う。

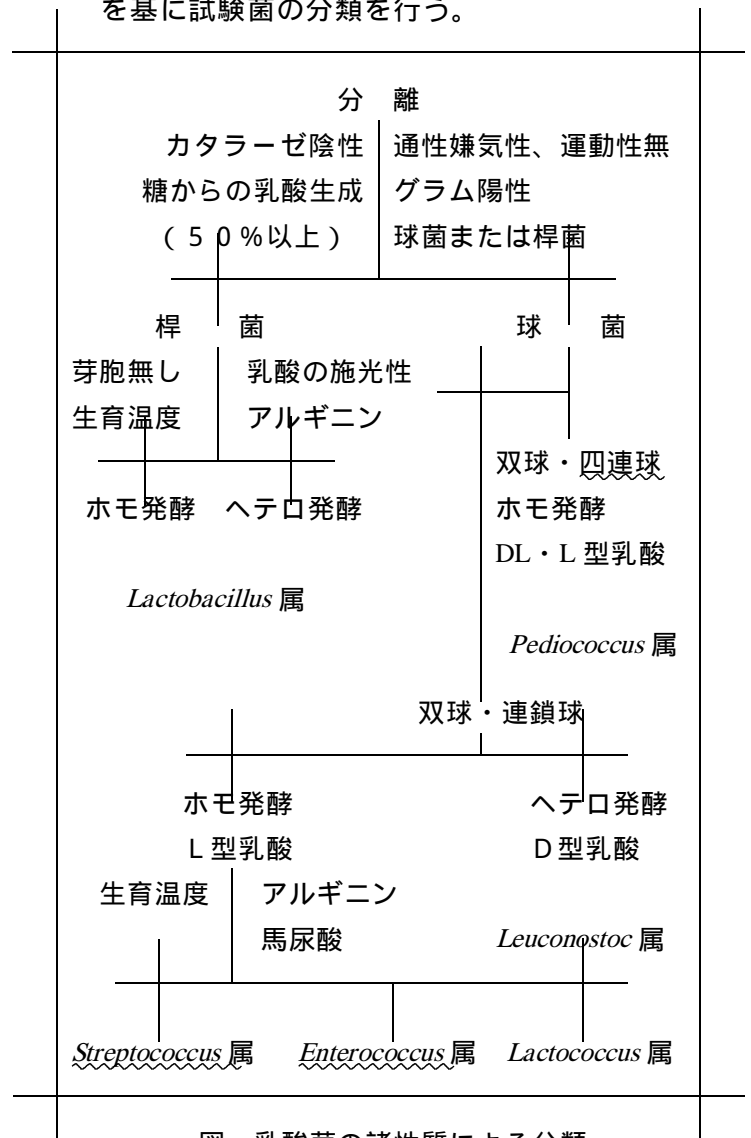


図 乳酸菌の諸性質による分類

発酵乳キテックより分離した乳酸菌では、*Lactobacillus helveticus* , *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* が、ハンセン社のヨーグルト及びチーズ用スターターからは *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*・vovar *lactis*・vovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* が確認された。単離した菌は、乳酸菌の性質や働きを理解するための実験・実習材料として有効に活用できる。

(3) 代謝機能の検討

乳酸菌の利用可能な代謝としては、乳糖とその構成糖を利用した乳酸発酵、粘性物質の生成、フレーバーの生成、タンパク質の分解、アミノ酸の代謝、デキストラン発酵、グルコースの異性化、マロラクチック発酵、安息香酸の生成、ビタミン合成、抗菌性物質生産などがある。

今回の研修では、発酵乳製品の製造で重要となる乳酸とジアセチル、アセトアルデヒドの生成について詳細な実験を行った。特に、新疆ウイグル自治区の発酵乳キテックから分離した

表 乳酸発酵とフレーバー生成の一般的な代謝

ホモ型乳酸発酵		
ラクトース	4 乳酸	+ 4 ATP
グルコース	2 乳酸	+ 2 ATP
(ラクトース グルコース+ガラクトース)		
ヘテロ型乳酸発酵		
ラクトース	2 乳酸 + 2 イタール	+ 2 CO <sub>2</sub> + 2 ATP
グルコース	乳酸 + イタール	+ CO <sub>2</sub> + ATP
2 グルコース 2 乳酸 + 3 酢酸 + 5 ATP (ビフィズ菌)		
クエン酸を利用したジアセチルの生成		
クエン酸	酢酸	+ オキザロ酢酸
ピルビン酸	ジアセチル	アセトイン
アセトアルデヒド (ヨーグルトフレーバー) の生成・蓄積		
ラクトース	グルコース	ピルビン酸
	アセトアルデヒド	
タンパク質	スレオニン	
	アセトアルデヒド	+ グリシン

*Streptococcus thermophilus* に属する高ジアセチル生成菌の代謝機能を調べた。この菌はクエン酸を代謝せずに、ラクトースから乳酸と高濃度のジアセチルを生成する。また、粘性物質も多く生成するため、ヨーグルトや発酵バターなどの風味改良への応用が期待できる。

(4) プラスミド DNA の検索

乳酸菌が持つ重要な形質の多くはプラスミド DNA に支配されている。このため、優良な乳酸菌の育種を進めるためには、プラスミド DNA の機能が重要である。そこで、簡易な電気泳動装置を使った DNA の観察方法を研修した。この方法は、乳酸菌以外の微生物や細胞にも応用でき生物学の実験教材として活用できる。

(5) バクテリオシン (抗菌活性物質) の検討

近年、乳酸菌の栄養・生理的効果が注目されているが、乳酸菌の生産するバクテリオシン(抗菌活性物質)についての研究も盛んで、その中でもナイシンは食品保存剤として利用されている。ナイシン以外にも種々のバクテオリシンが発見されているが、基本的な研究方法としてはペーパーディスク法が使われている。この方法は、動植物の病気に対する抗生物質の試験をはじめ、多くの分野で利用されている簡易な実験法である。機能性食品や家畜衛生の学習に有効な教材である。

3 おわりに

本稿執筆時には研修の途中でもあり、不十分な内容の報告となり、お詫び申し上げます。研修の最終段階では、発酵乳キテックから分離した高ジアセチル生成の乳酸菌を使った基礎製造実験を予定しています。このたびの研修では、乳製品製造、特に乳酸菌についての基本から応用面での知識や技術について多くの知見を得ることができました。今後、学校教育現場で積極的に活かすよう努力していきます。最後に、貴重な研修の機会を与えていただいた 文部省、岡山県教育委員会、所属校の校長先生をはじめ諸先生方、そして、研修中に懇切丁寧な御指導を頂いた岡山大学農学部教授宮本 拓先生、ならびに畜産食品機能学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。